Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

SPEZIFISCHE UND UNSPEZIFISCHE EFFEKTE DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE cAMP, cGMP, cIMP UND cCMP AUF DREI ANABOLE STOFFWECHSELWEGE IM KÄLBERRIPPENKNORPEL IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KLAUS SCHIPPERS
aus Mönchengladbach

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T.O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

SPEZIFISCHE UND UNSPEZIFISCHE EFFEKTE DER CYCLISCHEN NUKLEOTIDE cAMP, cGMP, cIMP UND cCMP AUF DREI ANABOLE STOFFWECHSELWEGE IM KÄLBERRIPPENKNORPEL IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

KLAUS SCHIPPERS
aus Mönchengladbach

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Diese Untersuchung wurde in dankenswerterweise durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kl 193/1o) ermöglicht.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 26. 1. 1979

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Neurath
Referent: Prof. Dr. T.O. Kleine
Correferent: Prof. Dr. H.J. Hering

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Verwendete Abkürzungen		1
1.	Einleitung	2
2.	Methodik	3
2.1.	Herstellung der Knorpelschnitte	3
2.2.	Inkubationsversuche in der Warburg-Apparatur	3
2.3	Weiterverarbeitung der inkubierten Knorpelschnitte	5
2.3.1.	Isolierung der Chondroitinsulfat-peptide	5
2.3.2.	Reinigung der Chondroitinsulfat-peptide	6
2.3.3.	Isolierung und Messung der Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) in den Knorpelschnitten	6
2.3.4.	Isolierung des Gesamtproteins	7
2.4.	Bausteinanalysen	8
2.4.1.	Bestimmung des Gesamtproteins mittels der Biuret-Reaktion	8
2.4.2.	Bestimmung der Uronsäure mittels der Carbazol-Reaktion	8
2.4.3.	Bestimmung von Sulfatestern mittels Benzidinreaktion	9
2.4.4.	Bestimmung von Leucin im Chondroi-tinsulfatpeptid	1o
2.5.	Messung der Radioaktivität	1o
2.6.	Statistische Berechnungen	11
3.	Ergebnisse	13
3.1.	Charakterisierung von Kälberrippen-knorpelschnitten und des daraus isolierten Chondroitinsulfatpep-tides	13

Seite

3.2.	Biosynthese von Chondroitinsulfat in Kälberrippenknorpelschnitten	13
3.2.1.	Effekt von cAMP, cAMP- und Adenin-Derivaten auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden	13
3.2.2.	Effekt von cGMP, cGMP- und Guanosin-Derivaten auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden	15
3.2.3.	Effekt von cIMP, cCMP und cUMP sowie ihrer 5-MP-Verbindungen auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden	17
3.3.	Biosynthese von Gesamtprotein	17
3.3.1.	Effekt von cAMP, cAMP- und Adenin-Derivaten auf die Biosynthese von Gesamtprotein	17
3.3.2.	Effekt von cGMP, cGMP- und Guanosin-Derivaten auf die Biosynthese von Gesamtprotein	19
3.3.3.	Effekt von cIMP, cCMP und cUMP sowie ihrer 5-MP-Verbindungen auf die Biosynthese von Gesamtprotein	19
3.4.	Anaerobe Glycolyse von Kälberrippenknorpelzellen	19
3.4.1.	Effekt von cyclischen Nukleotiden, deren Derivaten sowie von Nukleosiden und deren Basen auf die anaerobe Glykolyse	19
4.	Diskussion	22
5.	Zusammenfassung	25
6.	Literatur	26

Verwendete Abkürzungen

A-5-MP:	Adenosin-5'-monophosphat
8-Br-cAMP:	8-bromo-3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
8-Br-cGMP:	8-bromo-3',5'-cyclisches Guanosinmonophosphat
cAMP:	Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
cCMP:	Cytidin-3',5'-cyclisches Monophosphat
cGMP:	Guanosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
cIMP:	Inosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
C-5-MP:	Cytidin-5'-Monophosphat
c-UMP:	Uridin-3',5'-cyclisches Monophosphat
diBu-cAMP:	N^6-2'-O-dibutyryl-cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat
diBu-cGMP:	N^2-2'-O-dibutyryl-cyclisches-3',5'-Guanosinmonophosphat
DNS:	Desoxyribonucleinsäure
FG:	Frischgewicht
G-5-MP:	Guanosin-5'-Monophosphat
I-5-MP:	Inosin-5'-Monophosphat
U-5-MP:	Uridin-5-Monophosphat

1. EINLEITUNG

Relativ wenige Einzelheiten sind über die Wirkung der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP zum Beispiel auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatproteinen bekannt, geschweige denn über die Wirkung von cIMP, cCMP und cUMP, deren biologische Existenz für Säugetiere noch nachzuweisen ist. Aus diesem Grunde wurden hier diese cyclischen Nukleotide in einem semi-in-vitro-System aus Kälberrippenknorpelschnitten untersucht, das als Versuchsmodell für die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und von Gesamtprotein diente. Die anaerobe Glycolyserate ließ sich unter anaeroben Bedingungen ebenfalls untersuchen. Frühere Untersuchungen aus dem Arbeitskreis hatten gezeigt, daß Kälberrippenknorpelschnitte in vitro eine hohe Biosynthesekapazität für Chondroitinsulfatprotein und Gesamtprotein aufweisen auch unter anaeroben Bedingungen (9,1o).
Durch diese Untersuchungen soll einmal etwas über die Wirkungsweise dieser cyclischen Nukleotide in vitro eruiert werden, zum anderen könnten die Ergebnisse Hinweise über die Regulation dieser drei anabolen Stoffwechselwege in vivo bringen.

2. METHODIK

2.1. Herstellung der Knorpelschnitte (KLEINE et al., 1968)

Verwendet wurden Rippenknorpel drei bis vier Monate alter Kälber. 5 bis 24 Stunden nach der Tötung der Tiere wurden die zwischenzeitlich auf Eis gelagerten, von Perichondrium und Bindegewebe befreiten Knorpelstücke mit einem Mikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) in 5o bis 1oo µ dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden in einer Petrischale auf mit Medium (s. 2.2.1.) getränktem Filterpapier im Kühlraum aufbewahrt.

2.2. Inkubationsversuche in der Warburg-Apparatur

Unter Verwendung des Modells V85 der Fa. B. Braun, Melsungen wurden die Inkubationsversuche bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 75/min durchgeführt.

2.2.1. Zusammensetzung des Mediums aus drei Grundlösungen

Das Medium enthielt in 5oo ml Aqua bidest. 5o ml Grundlösung 1 und je 25 ml Grundlösung 2 und 3.

Grundlösung 1: In 1ooo ml Aqua bidest. waren 57,o4 g NaCl p.A., 1,6o g KH_2PO_4 p.A., 3,5o g KCl p.A., 2,2o g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ p.A. und 5o,oo ml o,o5 mol/l H_2SO_4 p.A. gelöst; mit 2 mol/l NaOH wurde die Lösung auf pH 7,2 eingestellt.

Grundlösung 2: In 25o ml Aqua bidest. wurden 8,4o g $NaHCO_3$ gelöst.

Grundlösung 3: In 25o ml Aqua bidest. wurden 11,5o g Glucose $\cdot H_2O$ gelöst.

2.2.2. Radioaktiv markierte Vorstufen der Chondroitinsulfat-proteinsynthese

$Na_2\ ^{35}SO_4^{2-}$ trägerfrei der Fa. Buchler, Braunschweig
pro Ansatz: 74o kBq pro 3oo mg Knorpelschnitte.
L-Leucin-4,5-^{3}H (N); spezifische Aktivität: 31,9 mCi/Mol.
pro Ansatz: 74o kBq pro 3oo mg Knorpelschnitte.
Die Substanzen wurden von der Fa. NEN, Dreieichenhain bei Frankfurt, bezogen.

2.2.3. Versuchsablauf

Im Eisbad wurden die Warburg-Gefäße mit 3oo mg Knorpelschnitten, Medium, Testsubstanzen und radioaktiven Precursern (im Seitenarm der Gefäße) zum Doppelmarkierungsversuch beschickt. Nach Vorinkubation bei 37°C für 2o min unter Begasung mit einem Gemisch aus 95% N_2 und 5% CO_2 erfolgte die Inkubation für 9o min und nach Äquilibrierung die Druckmessung der CO_2-Bildung.

2.2.4. Manometrische Messung der CO_2-Entwicklung (UMBREIT et al., 1964)

Die während der Inkubation von den Knorpelzellen entwickelte CO_2-Menge wurde nach der Formal $x = k \cdot h$ berechnet.
Dabei ist

x = entwickelte Menge CO_2 in µl unter Normalbedingungen (76o mm Hg, 0°C).

k = Gefäßkonstante; sie erfaßt alle dem Reaktionssystem und den Versuchsbedingungen zugeordneten und während des Versuches unveränderlichen Faktoren.

h = um die Druckdifferenz des Thermobarometers korrigierte Druckdifferenz in mm H_2O.

Die Gefäßkonstante k wird nach der Formel

$$k = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{p_o}$$ berechnet.

Dabei ist

V_g = Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß zuzüglich des Volumens der Manometerkapillaren bei Ausgangsstellung 15o abzüglich des eingefüllten Flüssigkeits- und Knorpelvolumens,

T = absolute Temperatur des Reaktionssystems in ^{o}K; hier die Temperatur des Wasserbades von 37°C, in ^{o}K = 237°C + 37°C,

V_f = Volumen der Probemengen im Reaktionsgefäß, hier 43oo µl,

α = Bunsenscher Absorptionskoeffizient. Er gibt die Löslichkeit von CO_2 in der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß bei 76o mm Hg an und ist auf eine bestimmte Temperatur bezogen. Bei 37°C beträgt er o,567.

p_o = Normaldruck = 1o.ooo mm einer Brodie-Lösung, hier als Manometersperrflüssigkeit verwendet.

Die während der Inkubation entwickelte Menge CO_2 ist ein Parameter für die anaerobe Glykolyse der Knorpelzellen. Sie wurde auf µ Mol CO_2 pro g Feuchtgewicht (g FG) für die erste und zweite Stunde berechnet.

2.3. Weiterverarbeitung der inkubierten Knorpelschnitte (KLEINE et al., 1968)

Nach 2 h wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 5 ml eiskalter o,25 mol/l Saccharose (Fa. E. Merck, Darmstadt) gestoppt. Anschließend wurden die Knorpelschnitte im Kühlraum bei 4°C dreimal mit je 5 ml Saccharose gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und gewogen.

2.3.1. Isolierung der Chondroitinsulfatpeptide (KLEINE et al., 1968)

2/3 der Knorpelschnitte wurden in Zentrifugengläsern mit 5 mg CM-Cellulose gebundenem Papain (o,2 - o,3 U/g; Fa. E. Merck, Darmstadt) und mit 2 ml wässrigem Inkubationspuffer pH 6,2

(o,1 mol/l Na-Acetat, o,oo5 mol/l Na-EDTA) 48 Stunden bei 6o°C ± 1°C im Wasserbad inkubiert. Zur Erzielung einer Konzentration von 5% Trichloressigsäure (TCE) wurde den Proben anschließend o,67 ml 2o%iger TCE zugesetzt. Nach 1 h auf dem Eisbad wurde im Kühlraum bei 6ooo Upm abzentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt. Der Niederschlag wurde zweimal mit 1 ml 5%iger TCE gewaschen und die vereinigten Überstände im Kühlraum mit festem $NaHCO_3$ auf pH 6 gebracht und bei 4°C durch internes Mischen eine Woche lang gegen Aqua bidest. dialysiert (Dialyseschläuche der Fa. Union Carbide Corporation, Chicago, USA). Im Dialysat wurden Glucuronsäure und Radioaktivitäten bestimmt. In den TCE-Niederschlägen wurden die Desoxyribonucleinsäuren bestimmt.

2.3.2. Reinigung der Chondroitinsulfatpeptide
(KLEINE et al., 1968)

Durch Cetylpyridiniumchlorid- (CPC) und Alkoholfällung wurden die Chondroitinsulfatpeptide des Dialysats wie folgt gereinigt: Nach 1 h Inkubation mit 2 ml 1o%igem CPC bei 37°C wurden die Proben über Nacht auf Eis gestellt und anschließend bei 1o°C 6o min bei 2o.ooo Upm abzentrifugiert. Die klaren Überstände wurden verworfen. Die CPC-gefällten Niederschläge wurden dreimal bei 25°C mit je 3 ml o,1 CPC in o,o3 mol/l NaCl gewaschen und in je 4 ml 2 mol/l $MgCl_2$ und 1 ml absolutem Methanol p.A. bei 37°C gelöst. Nachdem 12,5 ml Äthanol p.A. zugefügt waren, wurden die Proben über Nacht auf Eis gestellt, um die Chondroitinsulfatpeptide zu fällen. Danach wurde 2o min bei 0°C mit 2o.ooo Upm zentrifugiert. Die Niederschläge wurden zweimal mit je 2 ml eiskaltem 8o%igem Äthanol gewaschen, in 1 ml Aqua bidest. nochmals eine Woche lang im Kühlraum gegen H_2O dialysiert. Im Dialysat wurden Glucuronsäure, Sulfat und Radioaktivitäten bestimmt.

2.3.3. Isolierung und Messung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in den Knorpelabschnitten
(KLEINE und DAPPER, 1971)

Zur Bestimmung der DNS im TCE-gefällten Niederschlag des Papaindigestes wurden zunächst die Lipide durch zweimaliges Waschen mit

je 2 ml 98%igem Äthanol, eiskalt, entfernt. Nach Suspension des Niederschlages in 1,5 ml Aqua bidest. und Versetzen mit 1,5 ml 1o%iger TCE wurden die Proben 15 min im Wasserbad von 9o°C erhitzt; alle 5 min wurde gemischt. Anschließend wurde 1o min bei 6.ooo Upm zentrifugiert, der Niederschlag mit 1 ml 5%iger TCE gewaschen; in den vereinigten Überständen wurde die DNS bestimmt. Dazu wurde die Diphenylreaktion verwendet (SCHNEIDER, 1957).

Ausführung:

1 ml Probe (Doppelwerte) wurden mit 2 ml Diphenylaminreagenz (1g Diphenylamin und 2,75 ml konz. H_2SO_4 p.A. in 1oo ml Eisessig) 1o min im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Extinktion dieser Lösung im Zeiss-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von λ = 6oo nm und einer Schichtdicke von d = 2 cm gegen den Leerwert (1 ml 5% TCE statt Probe) gemessen.

Die mittlere Extinktion beträgt 2,526 pro mg DNS; sie wurde ermittelt durch eine Eichkurve von Heringssamen - DNS (Fa. Serva, Heidelberg), die von 1o bis 1oo µg linear verlief.

2.3.4. Isolierung des Gesamtproteins
(KLEINE et al., 1968)

Ein Drittel der Knorpelschnitte wurde in Zentrifugengläser gefüllt. Nach 24 h Extraktion mit 5 ml TCE 5% bei 0°C wurde dreimal mit je 5 ml TCE 5% gewaschen und die Überstände nach dem Zentrifugieren verworfen. Die Glasränder wurden mit trockener Watte abgewischt und die Knorpelschnitte 2o h mit 5 ml Aceton p.A. extrahiert; darauf wurde zweimal mit je 5 ml Aceton p.A. gewaschen und die Überstände verworfen. Nach nochmaligem Trockenen der Glasränder wurden die Niederschläge mit 2 ml 5% TCE 2o min bei 9o°C erhitzt und nach dem Zentrifugieren dreimal mit je 1 ml 5% TCE bei Zimmertemperatur gewaschen und schließlich in 1 ml 1 mol/l NaOH gelöst. Das Gesamtprotein wurde mittels der Biuret-Reaktion bestimmt.

2.4. Bausteinanalysen

2.4.1. Bestimmung des Gesamtproteins mittels der Biuret-Reaktion (WEICHSELBAUM, 1946)

Biuret-Reagenz: 9,o g Kaliumnatriumtartrat (Seignettesalz) und 3,o Kupfersulfat pulv. wurden in 4oo ml o,2 mol/l Natronlauge gelöst und nach Zugabe von 5,o g Kaliumjodid mit o,2 mol/l Natronlauge auf 1ooo ml ergänzt.
Ausführung: o,5 ml Probevolumen (Doppelwerte) und 1 ml Biuret-Reagenz wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben 3o min gerüttelt. Danach wurde die Extinktion gegen den Leerwert (o,5 ml H_2O) im Eppendorf-Photometer bei λ = 546 nm und d = 2 cm gemessen. Der Extinktionskoeffizient pro mg Protein wurde aus einer Rinderalbuminlösung (Behringwerke, Marburg, 5o mg in 1oo ml Aqua bidest. gelöst) ermittelt. Er betrug o,337 $E_{d = 2\ cm}^{546\ nm}$. Die Eichkurve verlief von o,o5 bis o,2 mg linear.

2.4.2. Bestimmung der Uronsäure mittels der Carbazol-Reaktion

Zur Bestimmung der Glucuronsäure in den Seitenketten des Chondroitinsulfats wurde die modifizierte Carbazol-Reaktion nach BITTER und MUIR (3) verwendet.
Im Eisbad vorgekühlte Reagenzgläser wurden mit je 5 ml Schwefelsäurereagenz (o,o25 molare Lösung von $Na_2B_4O_7 \cdot 1o\ H_2O$ der Fa. E. Merck, Darmstadt, in konzentrierter H_2SO_4, d = 1,84) beschickt. Nach Zugabe von 1 ml Probe (Doppelwerte) wurde unter Vermeidung von Wärmeentwicklung vorsichtig im Eisbad gemischt. Bei kleinerem Probevolumen als 1 ml wurde mit Aqua bidest. auf 1 ml ergänzt. Es wurden zwei Leerwerte mitgefahren (Aqua bidest. statt Probe). Die Proben kamen für 1o min in ein siedendes Wasserbad und wurden nach dem Abkühlen mit je o,2 ml Carbazol-Reagenz (o,125 %ige Lösung von Carbazol, Fa. E. Merck, Darmstadt, in 96 %igem Äthanol p.A.) versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben nochmals

für 15 min in ein siedendes Wasserbad gestellt. Dabei entstand eine Rotfärbung, deren Extinktion nach dem Abkühlen im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von λ = 546 nm und einer Schichtdicke von d = 1 cm gegen den Leerwert gemessen wurde.
Der mikromolare Extinktionskoeffizient wurde aus einer Eichkurve mit D (+) Glucurono-3,6-Lacton, gelöst in H_2O (Fa. Baker, Groß-Gerau), ermittelt, die zwischen o,o28 und o,568 µmol linear anstieg. In unserem Labor wurde mit einem Extinktionskoeffizienten von = 3,o6 $E^{546\ nm}_{d=1\ cm}$ gearbeitet.

2.4.3. Bestimmung von Sulfatestern mittels der Benzidin-Reaktion

Zur Bestimmung der Sulfatester in den Chondroitinsulfat-Seitenketten wurde die modifizierte Benzidin-Reaktion nach KLEINE et al. (1968) angewendet. Dazu mußten die Sulfatester durch Hydrolyse mit Ameisensäure freigesetzt werden.
Reagenzien:
7,95 mol/l HCOOH p.A., 1 %ige Lösung von Benzidin p.A. in absolutem Äthanol p.A., 1 mol/l HCl p.A., o,2 %ige Lösung von $NaNO_2$ p.A. in Aqua bidest., o,5 %ige Lösung von Thymol in 7,5 %iger wässriger Lösung von NaOH, sulfatfreier Glassand p.A. (alle Reagenzien von der Fa. E. Merck, Darmstadt).
Ausführung:
1 ml Probevolumen (Dreifachwerte) wurde mit o,6 ml 7,95 mol/l HCOOH versetzt und 1o h bei 1oo°C nach Zuschmelzen der Gläser hydrolysiert (Leerwerte: 1 ml Aqua bidest.). Dem Hydrolyseprodukt wurden je o,4 ml Aqua bidest. zugesetzt; anschließend wurden je 1,5 ml entnommen und im Eisbad mit 3,75 ml Benzidinlösung gemischt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Glassand wurde im Kühlraum bei 4°C 1o min bei 6ooo Upm. zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zentrifugengläser umgekehrt auf trockenes Filterpapier gestellt. Innen wurden die Gläser dann im Bereich der Öffnung mit äthanolgetränkten Wattetupfern, außen mit acetongetränktem Filterpapier gereinigt. Nach Zugabe von 9 ml

kaltem Äthanol p.A. wurde wiederum 1o min zentrifugiert, die Überstände verworfen und der Niederschlag in 2,5o ml 1 mol/l HCl gelöst. Der Lösung wurden 1 ml $NaNO_2$-Lösung und 4 ml Thymol-Reagenz zugesetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 1o min wurde jedem Glas o,3 ml entnommen und mit Aqua bidest. 1 : 1o verdünnt. Die Extinktion der entstandenen Rotfärbung wurde gegen den Leerwert mit dem Zeiss-Spektralphotometer bei λ = 49o nm und d = 1 cm gemessen.
Bei der Sulfatbestimmung war es erforderlich, eine Eichmeßreihe von Natriumsulfat p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt) mitzufahren. Dieser Standard ergab zwischen o,o2 und o,o6 µmol linear ansteigende Eichkurve. Der Extinktionskoeffizient betrug
ε = o,664 ± o,o27 $E^{\,49o\ nm}_{d=1\ cm}$.

2.4.4. Bestimmung von Leucin im Chondroitinsulfatpeptid

Nach 7 h Hydrolyse in 6 N HCl in einer Stickstoffatmosphäre wurde das Hydrolysat der gereinigten Chondroitinsulfatpeptidfraktion (s. 2.3.1.) auf Mikrosäulen eines Mikroaminosäurenanalysers (Fa. Labotron, Gelting) aufgetrennt mittels Resin 188o1, Puffer 1 (o,o7 mol/l Na-Zitrat pH 3,25) und Puffer 2 (o,o7 mol/l Na-Zitrat pH 4,25) sowie Norleucin als internem Standard.

2.5. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität (Doppelmarkierung) mußte in wässrigen neutralen und in alkalischen Proben ermittelt werden. Die Messung der ^{35}S- und ^{3}H-markierten Proben (Doppelwerte) wurde in einem Liquid Szintillation Counter (Modell 338o) mit Automatik (Modell 544) (Fa. Packard, Frankfurt) durchgeführt. Das Gerät gibt die Impulse pro Minute in Zerfälle pro Minute (dpm) an. Für neutrale Proben wurde Unisolve 1 (Fa. Zinsser, Frankfurt) verwendet. Als Leerwerte wurden je drei Zählgläser mit je o,4 ml H_2O in 1o ml Unisolve 1 mitgeführt.

2.5.1. Alkalische Proben

Der Szintillator hatte folgende Zusammensetzung:
8,o g 2,5-Diphenyloxazol für die Szintillationsmessung (Fa. E. Merck,Darmstadt),
o,6 g 2,2-p-Phenylenbis(4-methyl-5-phenyloxazol)Dimethyl-POPOP für Szintillationsmessung (Fa. E. Merck, Darmstadt),
15o g Naphtalin für Szintillationsmessung (Fa. E. Merck, Darmstadt),
5o g Thixotropic Gel Powder (Cab-O-sil), (Fa. Packard, Frankfurt) gelöst in 1ooo ml Dioxan für Szintillationsmessung (Fa. E. Merck, Darmstadt).
Die Messung erfolgte mit o,1 ml Probe in 15 ml Szintillator; Leerwert o,1 ml 1 mol/l NaOH.

2.6. Statistische Berechnungen

Aus den Kollektiven x_i und y_i (i = 1,2,3....n) mit nicht gepaarten Daten wurden mit Hilfe eines Hewlett-Packard Kleincomputers 9815 A (Frankfurt) Mittelwerte mit Standardabweichung und Student-t-Wert nach folgenden Formeln errechnet:

1. Arithmetisches Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. Standardabweichung

$$s_n = \sqrt{\frac{(x-x_i)^2}{n-1^i}} = \sqrt{\frac{(\sum x_i)^2 - \frac{1}{n}(\sum x_i)^2}{n-1}}$$

3. Student-t-Wert

$$t = \frac{\bar{y}-\bar{x}}{r_{\bar{x}-\bar{y}}}$$

$$\text{wobei } r_{\bar{x}-\bar{y}} = s_{x+y}\sqrt{\frac{1}{n_x}+\frac{1}{n_y}} = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x}-x_i)^2+(y-y_i)}{n_x-1+n_y-1}} \times \sqrt{\frac{1}{n_x}+\frac{1}{n_y}}$$

Dabei bedeuten:

n_x, n_y : Anzahl der Werte im Kollektiv

$\bar{x}$, $\bar{y}$: arithmetische Mittel der Werte

s_x, s_y : Standardabweichungen im Kollektiv

$r_{\bar{x}-\bar{y}}$: Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel

t : Student-t-Wert

3. E R G E B N I S S E

3.1. Charakterisierung von Kälberrippenknorpelschnitten und des daraus isolierten Chondroitinsulfatpeptides

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß sich mit den angewendeten Methoden Protein, DNS und Chondroitinsulfatpeptide isolieren lassen. Das Chondroitinsulfat weist einen Sulfatierungsgrad von ca. o,9 auf; auf eine Disaccharideinheit bestehend aus 1 mol Glucuronsäure und N-acetyl-Galaktosamin kommt in etwa 1 mol Leucinreste im Peptidrest (Tab. 1). Auf 1oo µg DNS bezogen ist der Disaccharidanteil von Chondroitinsulfat etwa 4mal größer als der Proteinanteil (Tab. 1).

3.2. Biosynthese von Chondroitinsulfat in Kälberrippenknorpelschnitten

Nach 9o min Inkubation mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Leucin (Doppelmarkierung) bauten Knorpelzellen diese radioaktiven Vorstufen ausreichend in Chondroitinsulfatpeptide und Gesamtprotein ein (Tab. 2), nämlich im Verhältnis der spezifischen Radioaktivitäten von Sulfatester zu Leucinreste zu Gesamtprotein wie 1 : 12 : 46.

3.2.1. Effekt von cAMP, cAMP- und Adenin-Derivaten auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden

Nach 9o min Inkubation mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Leucin (Doppelmarkierung) zusammen mit ansteigenden Konzentrationen von cAMP (2, 2o, 2oo oder 2ooo µmol/l) nahmen die prozentualen Einbauraten (in % der Kontrollen) fast linear zu, diejenigen der Leucinreste stärker als diejenigen der Sulfatester (Fig. 1, 2). Die Steigerungsraten von 2 µmol/l cAMP waren im selben Bereich wie diejenigen von 2oo µmol/l A-5-MP, diejenigen der höheren cAMP-Konzentrationen

A	DNS	Protein	Chondroitinsulfat-Peptid Glucuronsäure (GLS)	Sulfatester	Sulfatierungsgrad	Leucinreste
	µg / 1g FG	mg / 1g FG	µmol / 1g FG	µmol/ 1g FG	SO_4 / GLS	µmol/ 1g FG
Werte bezogen auf Gramm Feuchtgewicht (1g FG)	28o ± 8o n = 86	28,o ± 3,5 n = 155	1o9,o ± 1o,5 n = 165	99,1 ± 12,5 n = 165	o.91	1,1 ± o,6 n = 165

B	DNS	Protein	Chondroitinsulfat-Peptid Glucuronsäure	Sulfatester	Leucinreste
	µg / 1g FG	mg / 1oo µg DNS	mol / 1oo µg DNS	mol / 1oo µg DNS	µmol/ 1g FG
Werte bezogen auf 1oo µg Desoxyribonucleinsäure (DNS)	28o ± 8o n = 86	9,8 ± 2,5 n = 86	37,6 ± 1o,1 n = 86	36,5 ± 8,5 n = 86	o,4 ± o,2 n = 86

Tabelle 1A, B: Zusammensetzung des Rippenknorpels vom Kalb und des daraus isolierten gereinigten Chondroitinsulfatpeptides.

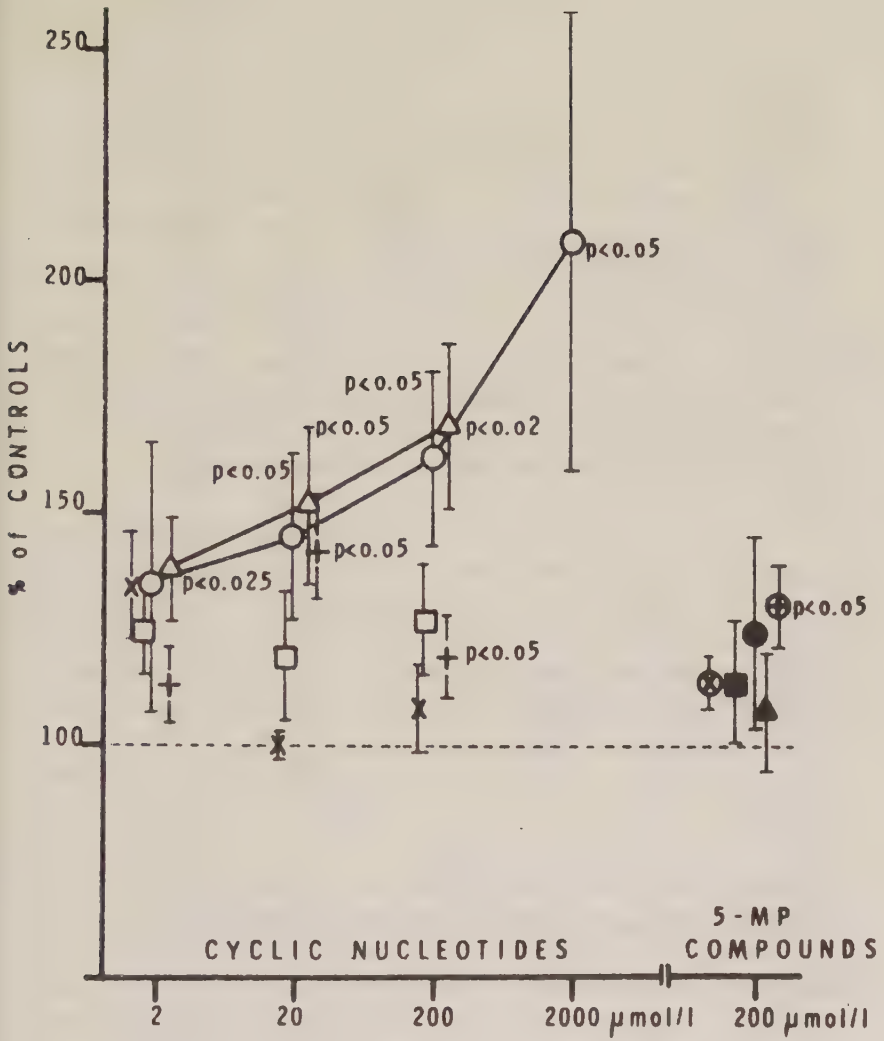

Fig. 1 Effekt von cyclischen Nukleotiden und ihren 5-Monophosphaten auf die $^{35}SO_4^{2-}$-Markierung von Chondroitinsulfatpeptiden in Knorpelschnitten in vitro. Mittelwerte mit Standardfehler von 3 bis 6 Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Kontrollen (1oo%-Werte siehe Tab. 2) und denjenigen der Proben wurden mittels dem t-Test nach Student berechnet und angezeigt. Die Symbole bedeuten: o cAMP, ● A-5-MP △ cGMP, ▲ G-5-MP, □ cIMP, ■ I-5-MP, + cCMP, ⊕ C-5-MP, × cUMP, ⊗ U-5-MP.

	Chondroitinsulfatpeptide		Gesamtprotein	Anaerobe Glycolyse
	Sulfatester ^{35}S Bq/µmol SO_4^{2-}	Leucinreste ^{3}H Bq/µmol Leu	^{3}H Leu Bq mg Protein	µmol CO_2 x h^{-1} x g^{-1} Feuchtgewicht
Kontrollen	48 ± 1,5	616 ± 64	2208 ± 233	2,05 ± 0,17
(n=4-6)	100 ± 3%	100 ± 10%	100 ± 11%	100 ± 8%
20 µmol/l cAMP (n=4-5)	145 ± 30%	173 ± 39%	124 ± 16%	122 ± 7 %
+ 1 mmol/l Theophyllin (n=2)	209 ± 10%	228 ± 15%	161 ± 25%	158 ± 19%
+ 15 mg/l SQ 20.009 (n=2)	230 ± 36%	245 ± 26%	168 ± 19%	162 ± 5 %
20 µmol/l diBu-cAMP (n=3)	196 ± 42%	293 ± 95%	135 ± 20%	158 ± 18%
20 µmol/l 8-Br-cAMP (n=2)	146 ± 5%	171 ± 4 %	120 ± 3 %	121 ± 5 %
200 µmol/l Adenosin (n=3-4)	169 ± 17%	150 ± 29%	167 ± 23%	147 ± 13%
+ 1 mmol/l Theophyllin (n=2)	259 ± 19%	279 ± 31%	231 ± 53%	143 ± 11%
200 µmol/Adenin (n=2)	190 ± 8%	215 ± 30%	152 ± 42%	133 ± 16%

Tabelle 2: Stimulierung von drei anabolen Stoffwechselprozessen in Kälberrippenknorpel durch cAMP im Vergleich zu den Effekten von Dibutyryl- und 8-Brom-cAMP und Adenosin sowie von Phosphodiesteraseinhibitoren.
Mittelwerte ± Standardabweichungen, anaerobe Glycolyserate während der 1. Stunde der Inkubation.
Alle cyclischen Nukleotide, Adenosin und Adenin wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen, Theophyllin von E. Merck, Darmstadt.

waren dagegen deutlich größer.

Obwohl 1 mmol/l Theophyllin und 15 mg/l SQ 2o.oo9 allein als Phosphodiesterasehemmer keinerlei Wirkung auf die Einbauraten dieser radioaktiven Vorstufen aufwiesen, erhöhten beide Substanzen zusammen mit 2o µmol cAMP den cAMP-Effekt um ca. 55% bzw. 75% (Tab. 2), was die Anwesenheit von endogenen Phosphodiesterasen in Kälberrippenknorpelschnitten anzeigt.

2o µmol/l diBu-cAMP entwickelte eine deutlich größere Steigerung der Einbauraten beider radioaktiven Vorstufen als 2o µmol/l cAMP, 2o µmol/l 8-Br-cAMP dagegen nicht (Tab. 2). Auch 2oo µmol/l Adenosin steigerte in ähnlicher Weise beide Einbauraten wie 2o µmol/l cAMP (die etwas höher waren als diejenigen von 2oo µmol A-5-MP (Fig. 1,2)), zusammen mit 1 mmol Theophyllin wurden noch um 1oo% höhere Einbauraten erzielt (Tab. 2). 2oo µmol/l Adenin erhöhte deutlich die Einbauraten im Vergleich zu 2oo µmol/l Adenosin (Tab. 2).

3.2.2. Effekt von cGMP, cGMP- und Guanosin-Derivaten auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden

Nach 9o min Inkubation mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Leucin (Doppelmarkierung) zusammen mit ansteigenden Konzentrationen von cGMP (2, 2o, 2oo µmol/l) wurde eine fast lineare Zunahme der Einbauraten beider radioaktiven Vorstufen erzielt, von der gleichen Größenordnung, wie sie bei denselben ansteigenden cAMP-Konzentrationen auftraten (Fig. 1,2). Auch hier war die Einbausteigerung in die Peptidreste höher als in die Sulfatester und lag deutlich über derjenigen, die durch 2oo µmol/l G-5-MP erzeugt wurde (Fig. 1,2).

2o µmol/l diBu-cGMP und 8-Br-cGMP zeigten keine oder keine größere Stimulierung als 2o µmol/l cGMP (Tab. 3). 2oo µmol/l Guanosin steigerte dagegen die Einbauraten beider radioaktiver Vorstufen mehr als 2o µmol/l cGMP; der Effekt nahm in Gegenwart von 1mmol/l Theophyllin deutlich zu (Tab. 3).

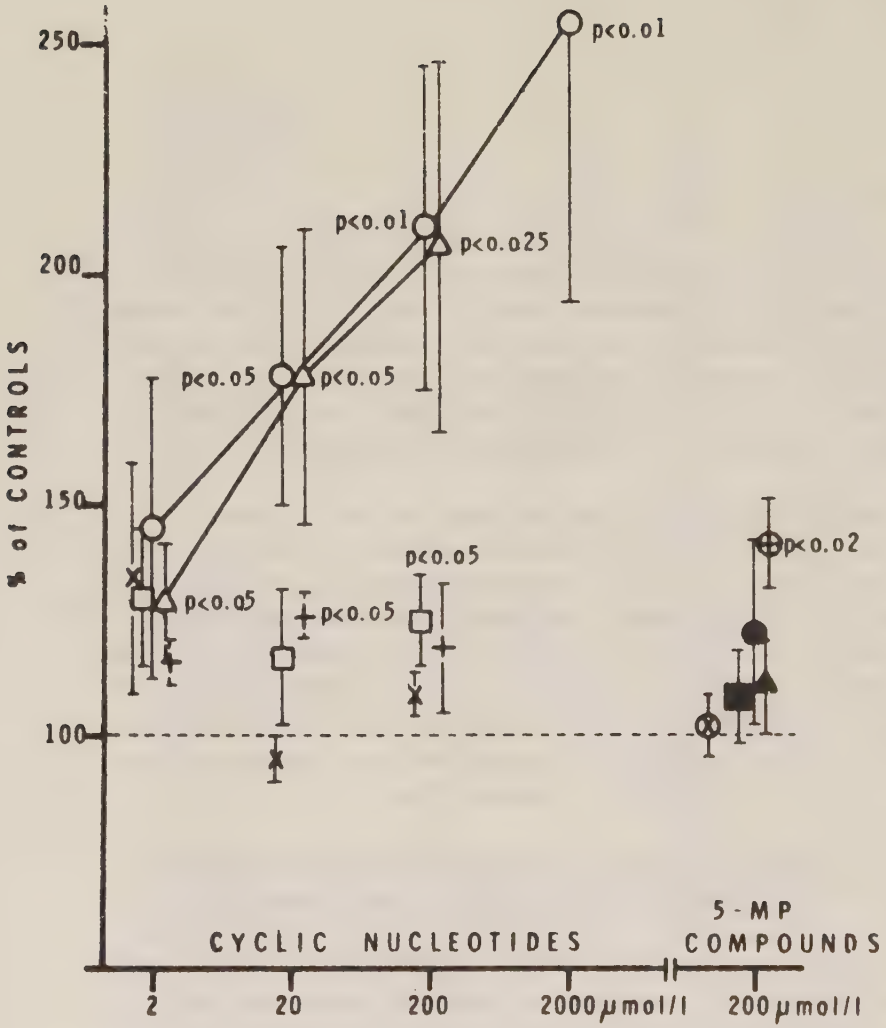

Fig. 2 Effekt von cyclischen Nukleotiden und ihren 5-Monophosphaten auf die [^{3}H]Leucin-Markierung von Chondroitinsulfatpeptiden in Knorpelschnitten in vitro. Mittelwerte mit Standard-Fehler von 3 bis 6 Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Kontrollen (100%-Werte siehe Tabelle 2) und denjenigen der Proben wurden mittels t-Test nach Student berechnet und angezeigt. Die Symbole bedeuten: o cAMP, ● A-5-MP, Δ cGMP, ▲ G-5-MP, □ cIMP, ■ I-5-MP, + cCMP, ⊕ C-5-MP, × cUMP, ⊗ U-5-MP.

	Chondroitinsulfatpeptide		Gesamtprotein	Anaerobe Glycolyse
	Sulfatester ^{35}S Bq/µmol SO_4^{2-}	Leucinreste ^{3}H Bq/µmol Leu	^{3}H Leu Bq mg Protein	µmol CO_2 x h^{-1} x g^{-1} Feuchtgewicht
Kontrollen (n=4-6)	48 ± 1,5 1oo ± 3%	616 ± 64 1oo ± 1o%	22o8 ± 233 1oo ± 11%	2,o5 ± o,17 1oo ± 8%
2o µmol/l cGMP (n=3-4)	152 ± 24%	178 ± 38%	1o4 ± 11%	122 ± 1o%
2o µmol/l diBu-cGMP (n=3-4)	124 ± 1o%	123 ± 1o%	171 ± 16%	122 ± 27%
2o µmol/l 8-Br-cGMP (n=3)	144 ± 9 %	138 ± 23%	143 ± 12%	122 ± 16%
2oo µmol/l Guanosin (n=3)	189 ± 12%	22o ± 2o%	168 ± 33%	139 ± 8 %
+ 1 mmol/l Theophyllin (n=2)	215 ± 27%	268 ± 17%	152 ± 9 %	178 ± 17%
1 mmol/l Theophyllin (n=4-6)	123 ± 28%	127 ± 29%	113 ± 15%	12o ± 18%
15 mg/l SQ 2o.oo9 (n=2)	116 ± 13%	111 ± 6 %	98 ± 5 %	124 ± 12%

Tabelle 3: Stimulierung von drei anabolen Stoffwechselprozessen in Kälberrippenknorpel durch cGMP im Vergleich zu den Effekten von Dibutyryl- und 8-Brom-cGMP und Guanosin sowie Phosphodiesteraseinhibitoren.
Mittelwerte ± Standardabweichungen, anaerobe Glycolyserate während der 1. Stunde der Inkubation. Alle cyclischen Nukleotide und Guanosin wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen, SQ 2o.oo9 war ein Geschenk von Squibb, Princeton, N.J., USA.

3.2.3. Effekt von cIMP, cCMP und cUMP sowie ihrer 5-MP-Verbindungen auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatpeptiden

Im Gegensatz zu der starken Stimulierung der Einbauraten von $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Leucin unter zunehmenden Konzentrationen von cAMP und cGMP entwickelten 2, 2o und 2oo µmol/l cIMP nur einen geringen Effekt, ebenso 2oo µmol/l I-5-MP (Fig. 1,2). 2o µmol/l cCMP stimulierte beide Einbauraten signifikant, ebenso wie 2oo µmol/l C-5-MP (Fig. 1,2). 2 und 2oo µmol cCMP waren dagegen weniger aktiv. Die gleichen Konzentrationen von cUMP bzw. U-5-MP erwiesen sich als inaktiv (Fig. 1,2).

3.3. Biosynthese von Gesamtprotein

Die Einbauraten von [^{3}H]Leucin in das Gesamtprotein waren nach 9o min Inkubation mit [^{3}H]Leucin 3o bis 4omal höher als die Markierung des Chondroitinsulfatpeptides (Tab. 2).

3.3.1. Effekt von cAMP, CAMP- und Adenin-Derivaten auf die Biosynthese von Gesamtprotein

Im Gegensatz zur Chondroitinsulfatpeptidmarkierung mit [^{3}H]Leucin waren die Steigerungsraten, die durch 2, 2o, 2oo und 2ooo µmol/l cAMP erzielt wurden, deutlich niedriger (< 15o% der Kontrollen), jedoch bei 2oo und 2ooo µmol/l cAMP etwas höher als diejenigen von A-5-MP (Fig. 3).

Obwohl 1 mmol/l Theophyllin und 15 mg/l SQ 2o.oo9 allein keinerlei Wirkung auf den [^{3}H]Leucin-Einbau in das Gesamtprotein zeigten, steigerten beide Substanzen zusammen mit 2o µmol cAMP deutlich die Einbauraten über den geringen cAMP-Effekt (Tab. 2). 2o µmol/l diBu-cAMP und 8-Br-cAMP waren nur geringgradig wirksam wie 2o µmol/l cAMP (Tab. 2). Dagegen erhöhten 2oo µmol/l Adenosin deutlich die Einbauraten ähnlich wie 2oo µmol/l Adenin; ersterer

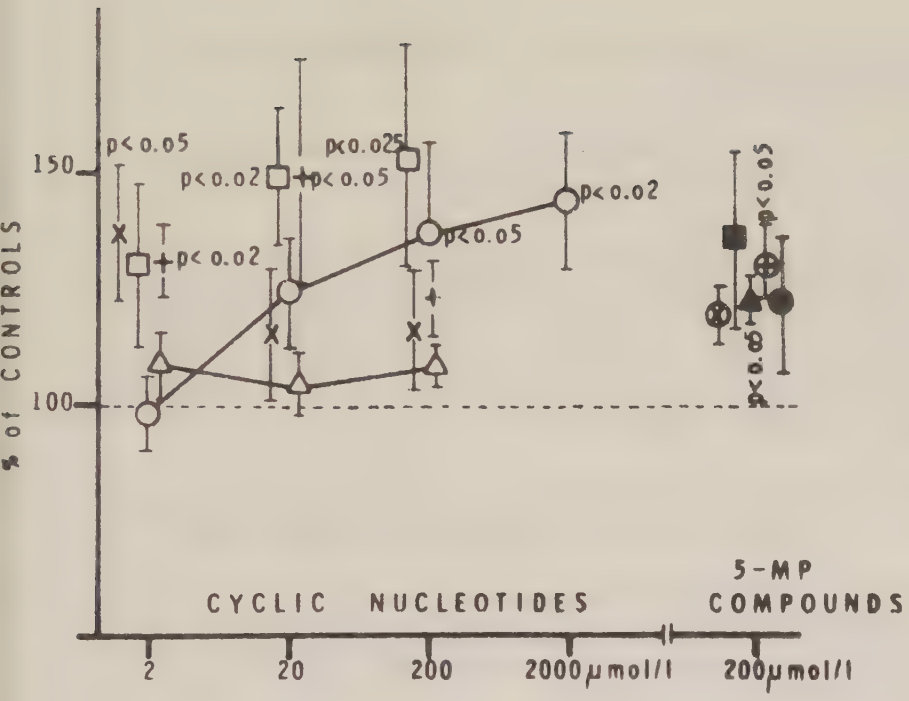

Fig. 3 Effekt von cyclischen Nukleotiden und ihren 5-Monophosphaten auf die [^{3}H]Leucin-Markierung von Gesamtprotein in Knorpelschnitten in vitro. Mittelwerte mit Standard-Fehler von 3-6 Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Kontrollen (1oo%-Werte siehe Tab. 2) und denjenigen der Proben wurden mittels t-Test nach Student berechnet und angezeigt. Die Symbole bedeuten:
o cAMP, • A-5-MP, △ cGMP, ▲ G-5-MP, □ cIMP, ■ I-5-MP,
+ cCMP, ⊕ c-5-MP, × cUMP, ⊗ U-5-MP.

Effekt wurde durch Zugabe von 1 mmol/l Theophyllin noch gesteigert (Tab. 2).

3.3.2. Effekt von cGMP, cGMP- und Guanosin-Derivaten auf die Biosynthese von Gesamtprotein

2, 2o und 2oo µmol/l cGMP zeigten keinerlei Stimulierung der [^{3}H]Leucin-Einbauraten in das isolierte Gesamtprotein im Gegensatz zu 2oo µmol/l G-5-MP (Fig. 3) und 2o µmol/l diBu-cGMP und 8-Br-cGMP (Tab. 3). Auch 2oo µmol/l Guanosin erhöhte die Einbauraten deutlich, die Gegenwart von 1 mmol/l Theophyllin hatte aber keinen zusätzlichen Effekt (Tab. 3).

3.3.3. Effekt von cIMP, cCMP und cUMP sowie ihrer 5-MP-Verbindungen auf die Biosynthese von Gesamtprotein

cIMP und cCMP erhöhten die Einbauraten von [^{3}H]Leucin in das Gesamtprotein, allerdings konzentrationsunabhängig und vergleichbar wie 2oo µmol/l I-5-MP und C-5-MP (Fig. 3). cUMP war inaktiv (Ausnahmen 2 µmol/l cUMP), nicht jedoch 2oo µmol/l G-5-MP (Fig. 3).

3.4. Anaerobe Glycolyse von Kälberrippenknorpelzellen

Die Zellen der Knorpelschnitte erzeugten unter den angegebenen in-vitro-Bedingungen (vgl. 2.2.4.) eine ausreichende CO_2-Produktion (s.Tab.3), die als Maß für die anaerobe Glycolyse anzusehen ist.

3.4.1. Effekt von cyclischen Nukleotiden, deren Derivaten sowie von Nukleosiden und deren Basen auf die anaerobe Glykolyse

Alle Konzentrationen von cAMP, cGMP, cCMP, cIMP und cUMP (2, 2o, 2oo oder 2ooo µmol/l) stimulierten leicht aber konzentrationsunabhängig die anaerobe Glycolyserate während der ersten Stunde der

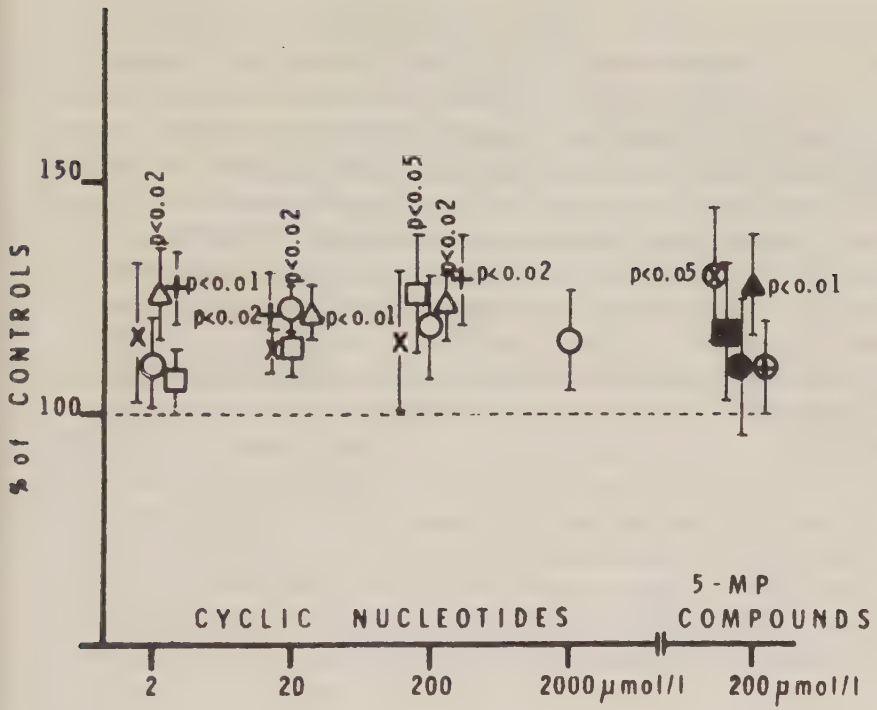

Fig. 4 Effekt von cyclischen Nukleotiden und ihren 5-Monophosphaten auf die CO_2-Produktion (anaerobe Glycolyserate) von Knorpelschnitten in vitro. Mittelwerte mit Standard-Fehler von 3-6 Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Kontrollen (1oo%-Werte siehe Tab. 2) und denjenigen der Proben wurden mittels t-Test nach Student berechnet und angezeigt.
Die Symbole bedeuten:
o cAMP, • A-5-MP, Δ cGMP, ▲ G-5-MP, □ cIMP, ■ I-5-MP,
+ cCMP, ⊕ C-5-MP, × cUMP, ⊗ U-5-MP.

Inkubation (um ca. 125%, Fig. 4), ähnlich geringe Wirkungen hatten ihre 5-Monophosphat-Verbindungen. Während der zweiten Stunde der Inkubation nahm der Effekt ab. Die anaerobe Glycoserate wurde deutlich gesteigert durch Zugabe von 1 mmol/l Theophyllin oder 15 mg/l SQ 2o.oo9 zu 2o µmol/l cAMP (Tab. 2). Beide Phosphodiesterasehemmer hatten allein dagegen keinerlei Wirkung. Auch 2o µmol/l diBu-cAMP, jedoch nicht 8-Br-cAMP, zeigte eine stärkere Wirkung; dies war jedoch nicht der Fall für 2oo µmol/l Adenin oder Adenosin ± 1 mmol Theophyllin (Tab. 2). 2o µmol/l diBu-cGMP und 8-Br-cGMP waren inaktiv, nicht dagegen 2oo µmol/l Guanosin, das in Gegenwart von 1mmol/l Theophyllin eine zusätzliche Stimulierung der anaeroben Glycolyse aufwies (Tab. 3).

4. DISKUSSION

Die meisten der hier untersuchten cyclischen Nukleotide, ebenso wie ihre dazugehörigen Basen, Nukleoside und 5-Nukleotide, bewirken die Stimulierung mindestens eines der hier untersuchten anabolen Stoffwechselwege in den Knorpelzellen, nämlich der Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und Gesamtprotein oder der anaeroben Glycolyse; dieser Effekt war jedoch von unterschiedlichem Ausmaß und unterschiedlicher Spezifität.

cAMP steigerte zwei- bis dreimal mehr die Markierungsraten der isolierten Chondroitinsulfatpeptide als diejenigen von Gesamtprotein; die anaerobe Glycolyserate wird durch cAMP nur leicht erhöht ähnlich wie durch A-5-MP, ein Abbauprodukt von cAMP. Die Stimulierung der Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und von Gesamtprotein erfolgt konzentrationsabhängig und ist größer als die Wirkung von A-5-MP. Damit erscheint die cAMP-Stimulierung beider anaboler Stoffwechselwege spezifisch und die geringe konzentrationsunabhängige Erhöhung der anaeroben Glycolyse unspezifisch.

Dieser cAMP-Effekt hängt offenbar von dem verwendeten System ab: Eine Stimulierung der Biosynthese von Glycosaminoglycanen und Glycoproteinen durch diBu-cAMP in Gegenwart von Theophyllin geschieht in transformierten Fibroblasten (8) und Mucosazellen des Colons (11), nicht aber im embryonalen Knorpel des Hühnchens, wo cAMP allein die Bildung von Makromolekülen in vitro leicht hemmte (6).

cGMP entwickelte eine spezifische Stimulierung der Chondroitinsulfatmarkierung ähnlich wie cAMP, nicht jedoch der Markierung des Gesamtproteins. Die anaeroben Glycolyseraten stiegen leicht an, jedoch konzentrationsunabhängig und damit unspezifisch. Dieser cGMP-Effekt erscheint unabhängig von einer Hemmung der

Phosphodiesteraseaktivität zu sein, da diBu-cGMP (und 8-Br-cGMP) -stabil gegenüber diesem Enzym - keine Steigerung der Inkubationsraten hervorriefen.

Da cGMP im gleichen Ausmaß wie cAMP die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein in meinen Versuchen steigerte, kann eine über cAMP vermittelte cGMP-Wirkung ausgeschlossen werden, wie sie mit Leberperfusionsexperimenten beschrieben worden ist, wo cGMP nur ein Drittel bis einhalb mal so effektiv wie cAMP die Glucosebildung stimulierte (7). In zellfreien Systemen, aktivierbar durch cAMP, entwickelte cGMP vergleichbar stimulierende Effekte , nur in zehn- bis hundertfach höheren Konzentrationen (7,12).

cIMP und cCMP erzeugten eine Steigerung mindestens eines der drei hier untersuchten anabolen Stoffwechselwege, jedoch war die Steigerung meistens konzentrationsunabhängig und damit unspezifischer Art, da ähnliche Effekte auch mit C-5-MP und I-5-MP (manchmal auch mit U-5-MP) erzielt wurden. cUMP war fast inaktiv. Die Wirkungsmechanismen dieser Effekte bleiben weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Meine Experimente mit Theophyllin und SQ 2o.oo9, welches ein stärkerer Phosphodiesterasehemmer ist als Theophyllin ((2) und Tab. 2), weisen auf die Existenz endogener Enzyme hin, die cyclische Nukleotide in den Knorpelschnitten abbauen, ähnlich wie in anderen Systemen (1,18): Beide Inhibitoren erhöhten die cAMP-Effekte signifikant. Dafür spricht auch die stärker stimulierende Wirkung von diBu-cAMP, nicht jedoch von 8-Br-cAMP, im Vergleich zu cAMP auf die drei untersuchten anabolen Stoffwechselwege (vgl. 6). In den Ovarialzellen von chinesischen Hamstern erhöhte diBu-cAMP den intrazellulären cAMP-Spiegel, nicht jedoch 8-Br-cAMP, das direkt die intrazelluläre cAMP-abhängige Proteinkinase stimulierte (12).

Adenosin, das die Adenylcydase in menschlichen Fibroblasten (5), in Knochenzellen von Ratten (13,14) und in Gehirnzellen in Kultur (4,5) oder in Gehirnschnitten (16) steigerte, stimulierte auch die drei untersuchten anabolen Stoffwechselwege in Knorpelschnitten, wobei die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein zusätzlich durch die Gegenwart von Theophyllin noch gesteigert werden konnte. Guanosin steigerte die drei Stoffwechselwege ähnlich wie Adenosin, nämlich in der Reihenfolge: Chondroitinsulfatprotein $\geq$ Gesamtprotein $>$ anaerobe Glycolyserate. Damit dürfte Guanosin eine andere Wirkungsweise in Knorpelzellen entfalten als cGMP (s.o.). Diese Stimulierung könnte durch eine Aktivierung der Guanylatcyclase erfolgen; allerdings steigerte Theophyllin nur den Guanosineffekt in Bezug auf die anaerobe Glycolyserate.
Adenin stimulierte die drei anabolen Stoffwechselwege in meinen Versuchen ähnlich wie Adenosin und Guanosin. Meine Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denjenigen der oben beschriebenen Systeme (4,5,13,14,16), wo weder Guanosin noch Adenin irgendeine Wirkung hatten.

Weitere Untersuchungen mit Zellextrakten müssen durchgeführt werden, um zu zeigen, ob diese Effekte primärer Natur sind, oder aber erst durch Abbau obiger Substanzen in den Knorpelzellen entstehen. Außerdem muß eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Nukleotidcyclasen gegenüber oben verwendeten Substanzen diskutiert werden, da die Adenylatcyclase aus embryonalen Knorpelzellen des Hühnchens offenbar durch Adenosin gehemmt wird (6,15).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP stimulierten konzentrationsabhängig die Markierungsraten von Chondroitinsulfatprotein mit $^{35}SO_4^{2-}$ und [^{3}H]Leucin in Schnitten von Kälberrippenknorpel unter anaeroben in-vitro-Bedingungen; diese Effekte sind als spezifisch anzusehen, da A-5-MP und G-5-MP deutlich geringere Wirkungen aufwiesen. Beide cyclischen Nukleotide erhöhten nur geringfügig die anaeroben Glycyseraten konzentrationsunabhängig ähnlich wie ihre 5-MP-Verbindungen. Damit ist dieser Effekt als unspezifisch anzusehen. cAMP (nicht cGMP) stimulierte konzentrationsabhängig und weniger stark den [^{3}H]Leucineinbau in das Gesamtprotein.

Guanosin und Adenosin (ebenso Adenin) steigerten ähnlich oder stärker diese drei anabolen Stoffwechselwege wie cAMP und cGMP in der Reihenfolge Chondroitinsulfatprotein $\geq$ Gesamtprotein $>$ anaerobe Glycolyse. Einige dieser Stoffwechselwege konnten zusätzlich stimuliert werden durch die Anwesenheit der Phosphodiesteraseinhibitoren Theophyllin oder SQ 2o.oo9 z.B. in Gegenwart von cGMP oder Guanosin bzw. cAMP oder Adenosin. diBu-cAMP (nicht 8-Br-cAMP) stimulierte diese drei anabolen Stoffwechselwege stärker als cAMP;diBu-cGMP und 8-Br-cGMP erhöhten nur die Markierungsraten des Gesamtproteins.

cCMP und cIMP steigerten geringfügig mindestens einen dieser drei anabolen Stoffwechselwege konzentrationsunabhängig und damit unspezifisch ähnlich wie C-5-MP und I-5-MP; cUMP war fast inaktiv.

Die Ergebnisse machen spezifische und unspezifische Effekte von cGMP sehr wahrscheinlich, die ähnlich oder unterschiedlich von denjenigen von cAMP waren.

6. L I T E R A T U R

1. L.F. ADAMSON: Stimulation by N^6,O^2-Dibutyryl Adenosine 3',5'-Cyclic Phosphate of Amino Acid Transport, Protein Synthesis and Chondroitin Sulfate Synthesis in Embryonic Bone in vitro, Contrasted with the Effects of Thyroid Hormones. Biochim.Biophys.Acta 201, 446-452 (1970)

2. B. BEER, M. CHASIN, D.E. CLODY, J.R. VOGEL and Z.P. HOROWITZ: Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase in Brain: Effect on Anxiety. Sciene 176, 428-430 (1972)

3. T. BITTER and H.M. MUIR: A modified uronic acid carbazole reaction. Analyt.Biochem. 4, 330-334 (1962)

4. A.J. BLUME and C.J. FOSTER: Mouse Neuroblastoma Adenylate Cyclase. Adenosine and Adenosine Analogues as Potent Effectors of Adenylate Cyclase Activity. J.Biol.Chem. 250, 5003-5008 (1975)

5. R.B. CLARK and M.N. SENEY: Regulation of Adenylate Cyclase from Cultured Human Cell Lines by Adenosine. J.Biol.Chem. 251, 4239-4246 (1976)

6. M.K. DREZNER, F.A. NEELSON and H.E. LEBOVITZ: Stimulation of Cartilage Macromolecule Synthesis by Adenosine 3',5'-Monophosphate. Biochim.Biophys.Acta 425, 521-531 (1976)

7. J.H. EXTON, J.G. HARDMAN, T.F. WILLIAMS, E.W. SUTHERLAND and C.R. PARK: Effects of Guanosine 3',5'-Monophosphate on the Perfused Rat Liver. J.Biol.Chem. 246, 2658-2664 (1971)

8. J.F. GOGGINS, G.S. JOHNSON and J. PASTAN:The Effect of Dibutyryl Cyclic Adenosine Monophosphate on Synthesis of Sulfated Acid Mucopolysaccharides by Transformed Fibroblasts. J.Biol.Chem. 247, 5759-5764 (1972)

9. T.O. KLEINE und F. DAPPER: Der Einfluß der Antirheumatika Butazolidin, Tanderil, Natrium-Salizylat und Indometacin auf die Biosynthese des Chondroitinsulfates im Rippenknorpel von Kalb und Rind. In: "Molekulare und zelluläre Aspekte des Alterns" (Hrg. D. PLATT und H.-G. LASCH) F.K. Schattauer Verlag Stuttgart 1971 S. 97-1o2.

1o. T.O. KLEINE, H.J. KIRSIG und H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine II. Über die Koordinierung von Protein-, Polysaccharid- und Sulfatester-Synthese im Rippenknorpel von Kälbern. Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 349, 1o37-1o48 (1968)

11. J.T. LAMONT and A. VENTOLA: Stimulation of Colonic Glycoprotein Synthesis by Dibutyryl Cyclic AMP and Theophylline. Gastroenterology 72, 82-86 (1977)

12. J.P. O'NEILL, A.P. LI and A.W. HSIE: Action of Cyclic Nucleotide Analogues in Chinese Hamster Ovary Cells. Biochim.Biophys. Acta 497, 35-35 (1977)

13. W.A. PECK, J. CARPENTER and K. MESSINGER: Cyclic 3',5'-Adenosine Monophosphate in Isolated Bone Cells. II. Responses to Adenosine and Parathyroid Hormone. Endocrinology 94, 148-154 (1974)

14. W.A. PECK, J.G. CARPENTER and R.J. SCHUSTER: Adenosine Mediated Stimulation of Bone Cell Adenylate Cyclase Activity. Endocrinology 99, 9o1-9o9 (1976).

15. G.A. RODAN, L.A. BOURRET and L. CUTLER: Membrane Changes During Cartilage Maturation. Increase in 5'-Nucleotidase and Decrease in Adenosine Inhibition of Adenylate Cyclase. J.Cell Biol. 72, 493-5o1 (1977)

16. A. SATTIN and T.W. RALL: The Effect of Adenosine and Adenine Nucleotides on the Cyclic Adenosine 3',5'-Phosphate Content of Guinea Pig Cerebral Cortex Slices. Molecular Pharmacology 6, 13-23 (197o)

17. W.C. SCHNEIDER in: Methods in Enzymology, Vol. III, p. 68o Academic Press, New York, 1957

18. M. SZABO and G. BURKE: Uptake and Metabolism of 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate and N^6,O^2-Dibutyryl 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate in Isolated Bovine Thyroid Cells. Biochim.Biophys.Acta 264, 289-299 (1972)

19. W.W. UMBREIT, R.H. BURRIS and J.F. STAUFFER: Manometric Techniques Burgess Publishing Company, Minneapolis 1964

2o. T.E. WEICHSELBAUM: Amer.J.clin.Path.(Techn.Sect.) 1o, 4o (1946)

Lebenslauf

Ich wurde am 5. 1. 1948 in Mönchengladbach als Sohn von Wilhelm Schippers und Maria Schippers geboren. Ich besuchte vier Jahre lang die Volksschule in Mönchengladbach und wechselte dann auf das Städt. Math. Naturw. Gymnasium in Mönchengladbach über. Dort legte ich am 22. 5. 1968 die Reifeprüfung ab. Am 18. 1o. 1971 wurde ich im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg immatrikuliert. Am 13. 9. 1972 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich am 14. 3. 1974. Im September 1974 heiratete ich meine Ehefrau Gerda Schippers. Am 1o. 12. 1976 bestand ich die zahnärztliche Prüfung; die Bestallung als Zahnarzt wurde mir am 21. 1. 1977 erteilt. Seit Januar 1977 bin ich als Assistent in der freien Praxis tätig.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Ahrens, Amon, Baltzer, Bernhardt, Bode, Castenholz, Dimroth, Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heubel, Heuser, Janke, Karlson, Kleinsasser, Koecke, Koranski, Lauer, Lehmann, Ludwig, Maroske, Petry, Pfütz, Richter, Rohen, Rupec, Schiff, Schienbein, Schmidt, Schmitz - Moormann, Schneider, Schnell, Thoeneß, Wesemann, Wiegandt